

人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸及其抗 SARS 病毒的作用

发明提供了系列的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，它们由含一个或多个 CpG 的脱氧寡核苷酸单链 DNA 分子构成，能够刺激人外周血单个核细胞 (PBMC) 产生抗病毒物质，这些物质可作用于细胞使其抵抗病毒尤其是 SARS 病毒的攻击；提供了人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗 SARS 病毒作用和对 SARS 病毒引起的人 呼吸道 感染和其它感染性疾病的治疗和预防作用。

Artificial CpG-containing single-stranded oligodeoxynucleotides against SARS virus

The invention provides a series of artificial CpG-containing single-stranded oligodeoxynucleotides (ODNs), each of which consists of single-stranded oligodeoxynucleotide DNA molecule containing one or more CpG(s), wherein the ODNs can stimulate human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) to produce antiviral substances which can protect cell from attacking of SARS virus . Therefore, those CpG containing single-stranded oligodeoxynucleotides show a function of anti-SARS virus and can be used for preventing and treating human respiratory tract infection caused by SARS virus and other infectious disease.



CN031408214

图-1、

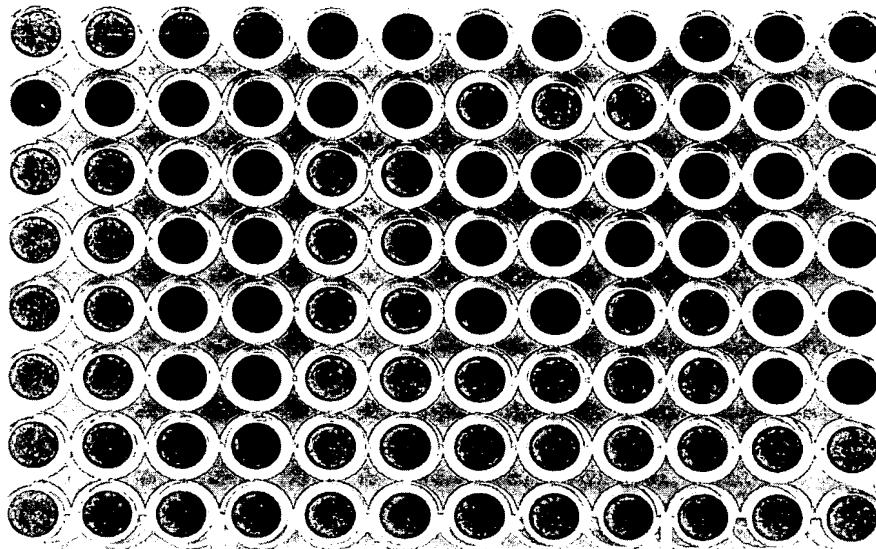
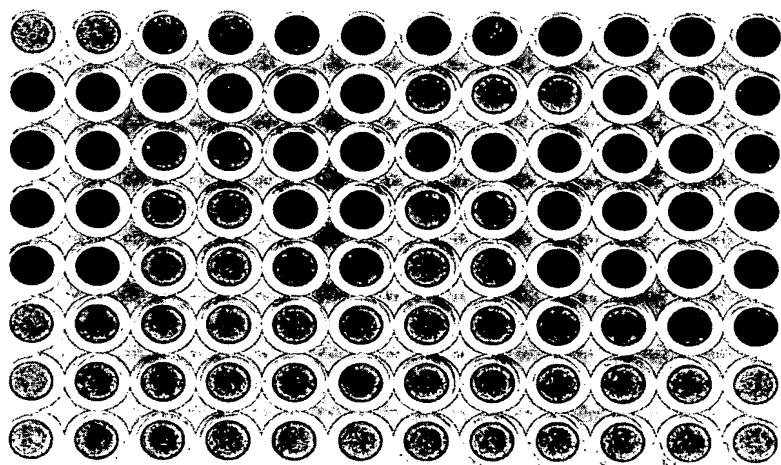


图-2、



人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸及其抗 SARS 病毒作用

技术领域

本发明涉及系列的人工合成的具有抗病毒作用的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，特别是涉及对 SARS 病毒引起的人呼吸道感染和其它感染性疾病有治疗和预防作用的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，以及用人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸治疗和预防由 SARS 病毒引起的人呼吸道感染和其它感染性疾病的技术方法和技术设想。

发明背景

CpG 是由胞嘧啶和鸟嘌呤通过磷酸连接成的二核苷酸。C 代表胞嘧啶，G 代表鸟嘌呤，p 代表磷酸，胞嘧啶位于 5' 端。多种具有 CpG 结构的细菌和病毒 DNA 对脊椎动物的免疫系统均为危险的信号，可激活多种免疫细胞启动对细菌和病毒的抵抗机制。近年来的研究表明，人工合成的含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA (CpG ODN) 也可表现强效的免疫增强和免疫调节作用，表现出明显的临床应用前景 (Weiner GJ, The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *J Leukoc Biol* 2000 Oct; 68 (4): 455-63)。

由于序列，尤其是 CpG 两侧的序列的不同，CpG ODN 可有多种多样的形式，表现不同性质、不同强度的免疫增强和免疫调节作用。有些 CpG ODN 可表现出种属依赖性，即对一种动物表现免疫增强功 CpG ODN，在另一种动物或人则未必表现出同样的或等效的免疫增强

功能 (Kamstrup S, et al. Response of porcine peripheral blood mononuclear cells to CpG-containing oligodeoxynucleotides, Vet Microbiol 2001 Feb 26; 78(4) 352-62; Gunther Hartmann, et al. Delineation of a CpG Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide for Activating Primate Immune Responses In Vitro and In Vivo, The Journal of Immunology, 2000, 164: 1617-1624)。

传染性非典型肺炎是由 SARS 病毒引起的人呼吸道的传染性疾病，可引发呼吸窘迫综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS)，感染者的死亡率为 4-12%。传染性非典型肺炎的病原体是一种变异了的冠状病毒——SARS 病毒。SARS 病毒和已知的冠状病毒在核酸水平有 50-60% 的同源性。在感染者的 1 毫升痰液中可含有 100 万个 SARS 病毒的 RNA 分子，在急性期病人的血浆中和康复后期病人的粪便中也可检出 SARS 病毒 RNA 分子 (Christian Drosten, Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome The New England Journal Of Medicine, 2003, 348;19)。

对由 SARS 病毒引起的人呼吸道的传染性疾病和呼吸窘迫综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS) 尚无有效的疗法。

发明内容

发明概述

本发明的目的之一是提供系列人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸特别是对可刺激人外周血细胞产生抗病毒尤其是抗 SARS 病毒物质的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸。它们由含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA 分子构成，其磷酸二酯键可以是部分硫化的，全部硫化的，也可以是未硫化的。优选地，本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸 具有 SEQ ID NO: 1- 所示的序列。

本发明的目的之二是提供本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗病毒作用、

特别是抗 SARS 病毒的作用。

本发明的目的之三是提供本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸对 SARS 病毒感染引起的人呼吸道的传染性疾病和呼吸窘迫综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS) 的治疗和预防的作用。

本发明的目的之四是提供用人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸治疗和预防由 SARS 病毒感染引起的人呼吸道的传染性疾病和呼吸窘迫综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS) 的技术方法和技术设想技术和思路。

另外，需要指出的是，在本申请的上下文的公开内容的基础上，本发明的其它具有实质性特点的方面和创造性的有益效果对本领域的普通技术人员来说是可以直接推知的。

具体实施方式

在本发明的上下文中，所使用的术语除非另外说明，一般具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。特别地，下列术语具有如下的含义：

优选地，本发明的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸具有如下所示的序列：

DVAX-1 : 5'-TCgTCgggTgCgACgTCgCAGgggggg -3'

DVAX-2 : 5'-gggggACgATCgTCgggggg-3

DVAX-3 : 5'-TCgTCgTTTCgTCgTTgggg -3'

DVAX-4 : 5'-TCgACgTTCgTCgTTCgTCgTTC-3'

DVAX-5 : 5'-TCggggACgATCgTCgggggg-3'

DVAX-6 : 5'-ggATCgATCgATCgATgggggg-3'

DVAX-7 : 5'-TgACTgTgAACgTTCgAgATgA-3'

DVAX-8 : 5'-TCgTCgAACgTTCgAgATgAT-3'

其中的磷酸二酯键可以是部分硫化的，全部硫化的，也可以是未硫化的。

本发明的 CpG 单链脱氧核苷酸可通过已知的方法生产，例如采用固相亚磷酰胺三酯法进行生产。以下的实施例详细地例举了一种生产本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的方法。

在预防和治疗由 SARS 病毒感染引起的人呼吸道的传染性疾病和呼吸窘迫综合征时，这些人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的一次用药剂量为 1-5000 微克。

本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的使用方式包括单独应用、两种或两种以上联合应用、与治疗病毒（尤其是 SARS 病毒）感染性疾病的药物或疫苗混合使用、与治疗和预防病毒（尤其是 SARS 病毒）感染性疾病的药物或疫苗通过交联剂共价偶联使用。

应用方式包括粘膜表面（包括呼吸道、消化道和泌尿生殖道黏膜）应用，皮下、肌肉注射应用，胃肠应用，腹腔应用，静脉注射等常用的方式。

在小鼠试验中，人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸 CpG 单链脱氧寡核苷酸的使用量为 0-500 微克/小鼠，如进行人体试验则按标准的换算方法进行换算。

下面结合具体的制备实施例和生物学效果实施例，并参照附图进一步详细地描述本发明。应理解，这些实施例只是为了举例说明本发明，而非以任何方式限制本发明的范围。

实施例

在如下实施例中，未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法，例如合成采用固相亚磷酰胺三酯法。

在如下实施例中，所用试剂的来源、商品名和/或有必要列出其组成成分者，均只标明一次。在其后所用相同试剂如无特殊说明，不再赘述上述内容。

实施例 1 人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的制备

采用固相亚磷酰胺三酯法合成人合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸。

1、试剂和材料：

三氯乙酸(Trichloroacetic Acid, TCA)、可控多孔玻璃(Controlled Pore Glass)、DMT(二甲氧基三苯甲基)、四氮唑活化剂、乙酸酐、N-甲基咪唑、A、T、C、G 四种核苷酸单体、ABI DNA 合成仪、高效液相色谱层析仪等

2、方法：

脱保护基

用三氯乙酸(Trichloroacetic Acid, TCA)脱去连结在可控多孔玻璃(Controlled Pore Glass)上的核苷酸的保护基团二甲氧基三苯甲基(DMT)，获得游离的 5'-羟基端，以供下一步缩合反应。

活化

将亚磷酰胺保护的核苷酸单体与四氮唑活化剂混合并进入合成柱，形成亚磷酰胺四唑活性中间体(其 3'-端已被活化，但 5'-端仍受 DMT 保护)，此中间体将与可控多孔玻璃上的已脱保护基的核苷酸发生缩合反应。

连接

亚磷酰胺四唑活性中间体遇到可控多孔玻璃上已脱保护基的核苷酸时，将与其 5'-羟基发生亲合反应，缩合并脱去四唑，此时合成的寡核苷酸链向前延长一个碱基。

封闭

缩合反应后为了防止连在可控多孔玻璃上的未参与反应的 5'-羟基在随后的循环反应中被延伸，常通过乙酰化来封闭此端羟基，一般乙酰化试剂是用乙酸酐和 N-甲基咪唑等混合形成的。

氧化

缩合反应时核苷酸单体是通过亚磷酯键与连在可控多孔玻璃上的寡核苷酸连接，而亚磷

酯键不稳定，易被酸、碱水解，此时常用碘的四氢呋喃溶液将亚磷酸转化为磷酸三酯，得到稳定的寡核苷酸。

经过以上五个步骤后，一个脱氧核苷酸就被连到可控多孔玻璃的核苷酸上，同样再用三氯乙酸脱去新连上的脱氧核苷酸 5'-羟基上的保护基团 DMT 后，重复以上的活化、连接、封闭、氧化过程即可得到一 DNA 片段粗品。最后对其进行切割、脱保护基(一般对 A、C 碱基采用苯甲酰基保护；G 碱基用异丁酰基保护；T 碱基不必保护；亚磷酸用腈乙基保护)、纯化(常用的有 HAP, PAGE, HPLC, C18, OPC 等方法)、定量等合成后处理即可得到符合实验要求的寡核苷酸片段。

未硫化的 CpG 单链脱氧寡核苷酸在 ABI 3900 DNA 合成仪上合成；全硫化及部分硫化 CpG 单链脱氧寡核苷酸的合成采用置换法，在 ABI 394 DNA 合成仪上合成。

实施例 2、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗病毒作用

1、滤泡口炎病毒 (VSV) 的扩增

仪器设备和材料：

低温冰箱、二氧化碳解箱、超净工作台、倒置显微镜、液氮罐、蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管等。

RPMI1640 培养基：

含 L- 谷氨酰胺的 RPMI1640 (GIBCOBRL) 10.4 克，2.0 克碳酸氢钠，10 万单位庆大霉素，加三蒸水至体积 1000 毫升。0.22 微米的滤膜真空泵抽滤除菌、分装。

方法：

用含 10% 小牛血清 (Invitrogen, 经 56℃ 30 分钟处理) 的 RPMI1640 培养基培养人羊膜上皮细胞 (FL)。在 100ml 培养瓶中长成单层后，更换培养液。加入含滤泡口炎病毒 (VSV) 的培养液，其含量为 400TCID50 / ml。设无病毒对照。约 24-48 小时后，感染 VSV 的人羊

膜上皮细胞几乎全部发生病变，收集病变细胞和上清，将其置 -20℃过夜。次晨，将其融解，用吸管猛烈吹打，离心收取上清。在测定 TCID₅₀ 后，将上清贮存于 -20℃备用。

2、滤泡口炎病毒 (VSV) TCID₅₀ 的测定

仪器设备和材料：

低温冰箱、二氧化碳孵箱、超净工作台、倒置显微镜、液氮罐、蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管等。

RPMI1640 培养基：

含 L- 谷氨酰胺的 RPMI1640 (GIBCOBRL) 10.4 克，2.0 克碳酸氢钠，10 万单位庆大霉素，加三蒸水至体积 1000 毫升。用 0.22 微米的滤膜滤过除菌、分装。

含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基：

10 毫升小牛血清 (Invitrogen, 经 56℃ 30 分钟处理)，90 毫升 RPMI1640 培养基。

0.5% 结晶紫染液：

结晶紫 0.5 克，NaCl 0.85 克，溶于 50 毫升无水乙醚。加 3 毫升甲醛，47 毫升蒸馏水。

结晶紫脱色液：50 毫升乙二醇单甲醚与 50 毫升蒸馏水混合。

0.25% 胰蛋白酶 (Trypsin)

方法：

用 0.25% 胰蛋白酶消化生长良好的人羊膜细胞，5 分钟。离心 (1000rpm, 5 分钟) 洗涤细胞。用 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基调细胞浓度为 4×10^5 个 / 毫升。加细胞悬液于

96孔平底培养板 (Costar), 每孔100微升, 设三个复孔。37℃ CO₂ 孵箱培养24小时后, 细胞形成单层。更换培养液, 其中含倍比稀释的待滴定VSV。设无VSV对照。24小时后, 用结晶紫染色的方法判定细胞病变的程度。吸弃培养液, 每孔加200μl 0.5%结晶紫染液, 37℃, 15分钟。流水冲掉结晶紫染液。每孔加入200μl 结晶紫脱色液, 振荡器振荡, 使染料完全从细胞内脱出, 用分光光度计在540nm波长处比色。以出现50%细胞病变的病毒稀释度的倒数X10为此病毒液的TCID₅₀/毫升数值。

3. 人外周血单个核细胞的分离

仪器设备和器材:

低温冰箱、二氧化碳孵箱、超净工作台、倒置显微镜、液氮罐、蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、滤菌器、滤过瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管、血球计数板、水平式离心机等。

试剂和材料:

肝素抗凝的人全血:

长春市中心血站。

聚蔗糖-泛影葡胺:

比重1.077±0.001, 北京鼎国生物技术有限公司。

RPMI1640培养液:

L - 谷 氨 酰 胺 的 RPMI1640(GIBCOBRL) 10.4 克 , 碳 酸 氢 钠 2.0 克, 庆大霉素10万单位, 加三蒸水至1000毫升。0.22微米的滤膜抽滤除菌、分装。

方法:

用聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分层液分离人外周血的单个核细胞。分层液与肝素抗凝外周血的体积比约为 2:1。水平离心 (1,000 xg, 20min)。用吸管吸取含单个核细胞的液带，置入另离心管中。加入等体积的无血清培养基。1,000g 离心 15min，弃上清。重复洗涤两次。弃上清，用 2ml 培养基重悬细胞。计细胞数。

4、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸抗病毒作用的测定

用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基调人外周血单个核细胞的终浓度为 3×10^6 个 / 毫升。加细胞悬液于 12 孔培养板，每孔 2 ml。加人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸 (6 μ g/ml)。37°C, 5% 二氧化碳孵箱培养 48 小时，收集上清。

将生长状态良好的人羊膜上皮细胞接种于 96 孔培养板，每孔 $3 \times 10^4 / 100\mu\text{l}$ 。按照表-1，表-2 加入 CpG 刺激上清及 IFN- α 2b (赛诺金) 标准品，37°C 5% CO₂ 培养 24 小时后，加入 250TCID₅₀ / ml 的 VSV 病毒，培养 48 小时。用结晶紫染色的方法判定细胞病变的程度。吸弃培养液。每孔加 200 μl 0.5% 结晶紫染液，37°C，15 分钟。流水冲掉结晶紫染液。每孔加入 200 微升结晶紫脱色液，振荡器振荡，使染料完全从细胞内脱出，用分光光度计在 540nm 波长测定分光光度值。结果见表-1a，表 1-b 和表-2a，表 2-b。

表-1a: 96 孔板各孔待测定的样品

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IFN- α 2b 3.9IU/ml	IFN- α 2b 7.8IU/ml	IFN- α 2b 15.6IU/ml	IFN- α 2b 31.3IU/ml	IFN- α 2b 62.5IU/ml	IFN- α 2b 125IU/ml						
B	IFN- α 2b 250IU/ml	IFN- α 2b 500IU/ml	IFN- α 2b 1000IU/ml	病 毒 对 照 (不加上清)	细胞对照 (不加上清和病 毒)							
C	Medium 1: 5 稀释	DVAX-1 1: 5 稀释	DVAX-1 对 照 1: 5 稀释	DVAX-2 1: 5 稀释	DVAX-7 1: 5 稀释	DVAX-8 1: 5 稀释						
D	Medium 1: 25 稀释	DVAX-1 1: 25 稀释	DVAX-1 对 照 1: 25 稀释	DVAX-2 1: 25 稀释	DVAX-7 1: 25 稀释	DVAX-8 1: 25 稀释						
E	Medium 1: 125 稀释	DVAX-1 1: 125 稀释	DVAX-1 对 照 1: 125 稀释	DVAX-2 1: 125 稀释	DVAX-7 1: 125 稀释	DVAX-8 1: 125 稀释						
F	Medium 1: 625 稀释	DVAX-1 1: 625 稀释	DVAX-1 对 照 1: 625 稀释	DVAX-2 1: 625 稀释	DVAX-7 1: 625 稀释	DVAX-8 1: 625 稀释						
G	Medium 1: 3125 稀 释	DVAX-1 1: 3125 稀释	DVAX-1 对 照 1: 3125 稀释	DVAX-2 1: 3125 稀释	DVAX-7 1: 3125 稀释	DVAX-8 1: 3125 稀释						
H	Medium 1: 15625 稀 释	DVAX-1 1: 15625 稀释	DVAX-1 对 照 1: 15625 稀释	DVAX-2 1: 15625 稀释	DVAX-7 1: 15625 稀释	DVAX-8 1: 15625 稀释						

说 明 书-CN031408214

释					
---	--	--	--	--	--

注释：DVAX-1 对照：是人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，其序列为：5'-TgCTTgggTggCAgCTgCCAggggg -3'

Medium：代表未加人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的培养上清

DVAX1, 2, 7, 8：代表加代号为 DVAX1, 2, 7, 8 人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的培养上清

表 1-b：人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗病毒作用

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.285	0.348	0.421	0.422	0.481	0.476	0.526	0.506	0.488	0.500	0.496	0.507
B	0.545	0.500	0.510	0.545	0.510	0.505	0.285	0.253	0.254	0.467	0.458	0.478
C	0.299	0.320	0.546	0.560	0.304	0.320	0.551	0.519	0.537	0.544	0.526	0.546
D	0.277	0.301	0.537	0.545	0.334	0.332	0.510	0.533	0.429	0.443	0.520	0.537
E	0.263	0.304	0.501	0.509	0.283	0.285	0.385	0.380	0.282	0.294	0.504	0.512
F	0.287	0.307	0.477	0.487	0.244	0.297	0.284	0.285	0.305	0.300	0.394	0.418
G	0.265	0.299	0.313	0.333	0.272	0.274	0.279	0.297	0.264	0.297	0.289	0.316
H	0.272	0.295	0.276	0.286	0.268	0.266	0.300	0.268	0.299	0.283	0.268	0.301

注释：表中的数值为用分光光度计在 540nM 波长测定分光光度值。分光光度值的大小和细胞受保护的程度成正比。

表 2-a：96 孔板各孔待测定的样品

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IFN-a2b 3.9IU/ml	IFN-a2b 7.8IU/ml	IFN-a2b 15.6IU/ml	IFN-a2b 31.3IU/ml	IFN-a2b 62.5IU/ml	IFN-a2b 125IU/ml						
B	IFN-a2b 250IU/ml	IFN-a2b 500IU/ml	IFN-a2b 1000IU/ml	病 毒 对 照 (不加上清)			细 胞 对 照 (不加上清和病毒)					
C	DVAX-3 1: 5 稀释	DVAX-3 对 照 1: 5 稀释	DVAX-4 1: 5 稀释	DVAX-4 对 照 1: 5 稀释	DVAX-5 1: 5 稀释	DVAX-6 1: 5 稀释						
D	DVAX-3, 1: 25 稀释	DVAX-3 对 照 1: 25 稀释	CpG-DVAX-4 1: 25 稀释	DVAX-4 对 照 1: 25 稀释	DVAX-5 1: 25 稀释	DVAX-6 1: 25 稀释						
E	CpG-DVAX-3 1: 125 稀释	DVAX-3 对 照 1: 125 稀释	CpG-DVAX-4 1: 125 稀释	DVAX-4 对 照 1: 125 稀释	DVAX-5 1: 125 稀释	DVAX-6 1: 125 稀释						
F	CpG-DVAX-3 1: 625 稀释	DVAX-3 对 照 1: 625 稀释	CpG-DVAX-4 1: 625 稀释	DVAX-4 对 照 1: 625 稀释	DVAX-5 1: 625 稀释	DVAX-6 1: 625 稀释						
G	CpG-DVAX-3 1: 3125 稀释	DVAX-3 对 照 1: 3125 稀释	CpG-DVAX-4 1: 3125 稀释	DVAX-4 对 照 1: 3125 稀释	DVAX-5 1: 3125 稀释	DVAX-6 1: 3125 稀释						
H	CpG-DVAX-3 1: 15625 稀释	DVAX-3 对 照 1: 15625 稀释	CpG-DVAX-4 1: 15625 稀释	DVAX-4 对 照 1: 15625 稀释	DVAX-5 1: 15625 稀释	DVAX-6 1: 15625 稀释						

注释：DVAX-3 对照：是人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，其序列为：5'-TgCTgCTTgCTgCTTgggg -3'

DVAX-4 对照：是人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，其序列为：

5'-TgCAgCTTgCTgCTTgCTgCTTC-3'

Medium: 代表未加入人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的培养上清

DVAX3, 4, 5, 6: 分别代表加代号为 DVAX3, 4, 5, 6 人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的培养上清

表 1-2: 人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗病毒作用

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.348	0.338	0.451	0.434	0.542	0.541	0.558	0.564	0.601	0.578	0.553	0.458
B	0.605	0.554	0.590	0.552	0.588	0.572	0.378	0.318	0.309	0.527	0.522	0.502
C	0.657	0.608	0.404	0.422	0.611	0.621	0.486	0.463	0.642	0.601	0.627	0.617
D	0.654	0.591	0.386	0.345	0.597	0.611	0.351	0.358	0.635	0.617	0.605	0.595
E	0.630	0.594	0.343	0.326	0.397	0.403	0.353	0.359	0.610	0.576	0.593	0.595
F	0.339	0.360	0.446	0.320	0.316	0.321	0.326	0.309	0.396	0.426	0.483	0.472
G	0.315	0.320	0.369	0.321	0.312	0.343	0.304	0.332	0.327	0.308	0.325	0.322
H	0.278	0.318	0.291	0.290	0.265	0.275	0.318	0.330	0.276	0.309	0.284	0.262

注释: 表中的数值为用分光光度计在 540nm 波长测定分光光度值。 分光光度值的大小和细胞受保护的程度成正比。

实施例 2 的实验证明, 本发明的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸具有明显的抗病毒作用。

实施例 3、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸抗 SARS 病毒的作用测定

仪器设备和材料:

低温冰箱、二氧化碳孵箱、超净工作台、倒置显微镜、液氮罐、蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管等。

RPMI1640 培养基:

含 L- 谷氨酰胺的 RPMI1640 (GIBCOBRL) 10.4 克, 2.0 克碳酸氢钠, 10 万单位庆大霉素, 加三蒸水至体积 1000 毫升。0.22 微米的滤膜真空泵抽滤除菌、分装。

0.5% 结晶紫染液:

结晶紫 0.5 克, NaCl 0.85 克, 溶于 50 毫升无水乙醚。加 3 毫升甲醛, 47 毫升蒸馏水。

方法:

用聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分层液分离人外周血的单个核细胞。分层液与肝素抗凝外周血的体积比约为 2:1。水平离心 (1,000 xg, 20min)。用吸管吸取含单个核细胞的液带, 置入另离心管中。加入等体积的无血清培养基。1,000g 离心 15min, 弃上清。重复洗涤两次。弃上清, 用 2ml 培养基重悬细胞。计细胞数。

用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基调人外周血单个核细胞的终浓度为 3×10^6 个 / 毫升。加细胞悬液于 12 孔培养板, 每孔 2 ml。加人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸 ($6\mu\text{g}/\text{ml}$)。37°C, 5% 二氧化碳孵箱培养 48 小时, 收集上清。

将生长状态良好的 Vero 细胞接种于 96 孔培养板, 每孔 $3 \times 10^4 / 100\mu\text{l}$ 。按照表-1a, 表-2a 加入人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸刺激上清及 IFN- α 2b (赛诺金) 标准品, 37°C 5

%CO₂ 培养 24 小时后。加入 250TCID₅₀/ml 的 SARS 病毒，培养 72 小时。用结晶紫染色的方法判定细胞病变的程度。吸弃培养液。每孔加 200 μl 0.5% 结晶紫染液，37℃，15 分钟。流水冲掉结晶紫染液。室温干燥后照相记录结果。

图-1、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗病毒作用

注释：96 孔板各孔待测定的样品如同表-1a

各孔颜色的深度和细胞受保护的程度成正比。颜色越深，存活的细胞越多。

图-2、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗病毒作用

注释：96 孔板各孔待测定的样品如同表-2a

各孔颜色的深度和细胞受保护的程度成正比。颜色越深，存活的细胞越多。

实施例 3 的实验证明，本发明的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸具有明显的抗 SARS 病毒的作用。应用本发明提供的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸可治疗和预防由 SARS 病毒感染引起的人呼吸道的传染性疾病和呼吸窘迫综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS)。此外，应用本发明提供的技术设想，可用人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸来治疗和预防由 SARS 病毒感染引起的人呼吸道的传染性疾病和呼吸窘迫综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS)。

1. 一种脱氧寡核苷酸，其特征在于它是含有一个或多个 CpG 的脱氧寡核苷酸。
2. 权利要求 1 所述的脱氧寡核苷酸，其特征在于其中的磷酸二酯键可以是部分硫化的、或全部硫化的、或未硫化的。
3. 权利要求 2 所述的脱氧寡核苷酸，其特征在于它具有 SEQ ID NO: 1-8 所示序列或者具有一个或多个核苷酸的保守性替代、添加、删除的 SEQ ID NO: 1-8 所示的核苷酸序列。
4. 权利要求 1-3 任一所述的脱氧寡核苷酸在 DNA 免疫和基因治疗中的应用。
5. 权利要求 1-3 任一所述的脱氧寡核苷酸在刺激细胞产生抗病毒中的应用。
6. 权利要求 5 所述的脱氧寡核苷酸在刺激细胞产生抗 SARS 病毒中的应用。
7. 权利要求 1-3 任一所述的脱氧寡核苷酸在制备治疗和预防病毒感染的制剂中的应用。
8. 权利要求 1-3 任一所述的脱氧寡核苷酸在制备治疗和预防由 SARS 病毒感染引起的人呼吸道感染和其它感染性疾病的制剂中的用途。
9. 权利要求 1-3 任一所述的脱氧寡核苷酸在制备治疗和预防由 SARS 病毒感染引起的人呼吸道感染和其它感染性疾病的疫苗中的用途。
10. 一种制备权利要求 1-3 任一所述脱氧寡核苷酸序列的方法，其特征在于通过人工合成的方法。
11. 权利要求 10 所述的方法，其特征在于通过化学人工合成的方法，其中的磷酸二酯键可以是部分硫化的或全部硫化的或未硫化的。
12. 权利要求 11 所述的方法，其特征在于通过固相亚磷酰胺三酯法合成。